

com. WO 98/30908

DIALOG(R) File 352:Derwent WPI  
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

011982395

WPI Acc No: 1998-399305/199834

Heterogeneous luminescent specific binding assay performed on whole blood  
- in sandwich or competitive format using a binding partner, specific for  
analyte, labelled with photoprotein, provides rapid analysis on small sample

Patent Assignee: DADE BEHRING INC (DADE-N)

Inventor: PANKRATZ T J; STOUT R W

Number of Countries: 023 Number of Patents: 009

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9830908	A1	19980716	WO 98US247	A	19980106	199834 B
AU 9858167	A	19980803	AU 9858167	A	19980106	199850
US 5876935	A	19990302	US 97780307	A	19970108	199916
CN 1216112	A	19990505	CN 98800017	A	19980106	199936
EP 956507	A1	19991117	EP 98901712	A	19980106	199953
			WO 98US247	A	19980106	
BR 9805892	A	19990824	BR 985892	A	19980106	200001
			WO 98US247	A	19980106	
JP 2000508075	W	20000627	JP 98531057	A	19980106	200036
			WO 98US247	A	19980106	
EP 956507	B1	20030402	EP 98901712	A	19980106	200325
			WO 98US247	A	19980106	
DE 69812897	E	20030508	DE 612897	A	19980106	200338
			EP 98901712	A	19980106	
			WO 98US247	A	19980106	

Priority Applications (No Type Date): US 97780307 A 19970108

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 9830908	A1	E	23	G01N-033/58	
				Designated States (National): AU BR CN JP RU	
				Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE	
AU 9858167	A			G01N-033/58	Based on patent WO 9830908
US 5876935	A			C12Q-001/68	
CN 1216112	A			G01N-033/58	
EP 956507	A1	E		G01N-033/58	Based on patent WO 9830908
				Designated States (Regional): DE ES FR IT	
BR 9805892	A			G01N-033/58	Based on patent WO 9830908
JP 2000508075	W		21	G01N-033/543	Based on patent WO 9830908
EP 956507	B1	E		G01N-033/58	Based on patent WO 9830908
				Designated States (Regional): DE ES FR IT	
DE 69812897	E			G01N-033/58	Based on patent EP 956507 Based on patent WO 9830908

Abstract (Basic): WO 9830908 A

Heterogeneous luminescent specific binding assay in whole blood  
comprises: (i) treating sample with first binding partner (BP1),  
labelled with a luminescent photoprotein (I), able to bind analyte  
(II); (ii) adding second binding partner (BP2), bound to a solid and  
also reactive with (II); (iii) separating the solid to remove complex  
formed; (iv) activating (I) in either the complex or in residual  
sample; and (v) detecting (II) from light emitted from (I).

In a modification (competitive assay), BP1 is replaced by a known  
quantity of (II) labelled with (I).

Also new are kits for these assays.

ADVANTAGE - The method is rapid, sensitive and requires only a  
small sample. The use of whole blood eliminates the need for sample  
preparation, so results are available more quickly, e.g. in an  
emergency.

Dwg. 0/1

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12Q-001/68; G01N-033/543; G01N-033/58

International Patent Class (Additional): G01N-033/532; G01N-033/553

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2000-508075

(P2000-508075A)

(43)公表日 平成12年6月27日(2000.6.27)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターマコード(参考)
G 0 1 N 33/543	5 4 1	G 0 1 N 33/543	5 4 1 Z
	5 1 5		5 1 5 D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 21 頁)

(21)出願番号	特願平10-531057	(71)出願人	デイド、ベーリング、インコーポレイテッド
(86) (22)出願日	平成10年1月6日(1998.1.6)		アメリカ合衆国60015イリノイ、ディヤフィールド、ディヤフィールドロード1717
(85)翻訳文提出日	平成10年9月4日(1998.9.4)	(72)発明者	バンクラッツ、トーマス ジョン
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 8 / 0 0 2 4 7		アメリカ合衆国19711デラウエア、ニューワーク、ノーススターロード257
(87)国際公開番号	W O 9 8 / 3 0 9 0 8	(72)発明者	スタウト、リチャード ウェイン
(87)国際公開日	平成10年7月16日(1998.7.16)		アメリカ合衆国19803デラウエア、ウイلمントン、グリーンネルロード1308
(31)優先権主張番号	0 8 / 7 8 0 , 3 0 7	(74)代理人	弁理士 赤岡 逸夫
(32)優先日	平成9年1月8日(1997.1.8)		
(33)優先権主張国	米国 (US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, BR, CN, JP, RU		

(54)【発明の名称】 発光特異的結合アッセイ

(57)【要約】

全血中の検体を検出するための発光特異的結合アッセイ。このアッセイは第1の結合試薬がルミネセンス発光タンパクで標識され、そして固定化された第2の結合試薬が捕獲試薬として作用する、不均質サンドイッチまたは競合アッセイである。ルミネセンス発光タンパクは、活性化によりルミネセンス検出器によって検出できる光を放射する。このアッセイは速くそして感受性であり、小さいサンプル体積に対して実施することができる。

(2)

**【特許請求の範囲】**

1. 全血中の不均質発光特異的結合アッセイ方法であって、

- (a) 検体を含有もしくは含有する疑いある全血のサンプルを得るステップ、
  - (b) サンプルを、検体へ結合することができ、かつ活性化により光を放射するルミネセンス発光タンパクで標識された第1の結合試薬と合併するステップ、
  - (c) サンプルを、検体へ結合することができ、かつ固体支持体へ固定化された第2の結合試薬と接触させるステップ、
  - (d) 複合体を生成する条件下で、前記第1および第2の結合試薬がサンプル中に存在する検体と反応することを許容するステップ、
  - (e) サンプルから固体支持体を分離することによってサンプルから複合体を分離するステップ、
  - (f) 固体支持体不含サンプル中のまたは固体支持体へ結合した複合体のルミネセンス発光タンパクを活性化するステップ、および
  - (g) 活性化したルミネセンス発光タンパク標識から放射される光を検出することによってサンプル中の検体の存在を測定するステップ、
- を含む前記方法。

2. 全血中の不均質特異的結合アッセイ方法であって、

- (a) 検体を含有もしくは含有する疑いある全血のサンプルを得るステップ、
- (b) サンプルを、活性化により光を放射するルミネセンス発光タンパクで標識した既知量のサンプルと合併するステップ、
- (c) サンプルを、検体と結合することができ、かつ固体支持体へ固定化された第2の結合試薬と接触させるステップ、
- (d) 複合体を生成するように前記第2の結合試薬が標識したおよび標識しない検体と反応することを許容するステップ、
- (f) 固体支持体不含サンプル中の、または固体支持体へ結合した複合体中のルミネセンス発光タンパク標識を活性化するステップ、および
- (g) サンプルからの光放射をサンプル中の検体の存在に相関させるステップ

(3)

を含む前記方法。

3. 第2の結合試薬は固体支持体へ直接結合している請求項1または2の方法。

4. 第2の結合試薬は検体と、そして固体支持体上に固定化された第3の結合試薬の両方へ結合することができ、このアッセイ方法は第3の結合試薬を固定化した固体支持体とサンプルを接触させることをさらに含んでいる請求項1または2の方法。

5. ルミネセンス発光タンパクはエクオリンである請求項1または2の方法。

6. 光タンパクはエクオリンである請求項4の方法。

7. エクオリン標識は活性化量のカルシウムイオンの添加によって光を放射するように活性化される請求項6の方法。

8. 固体支持体は磁性マイクロ粒子よりなる請求項6の方法。

9. ステップ(e)において規定した分離は磁場の適用によって

得られ、そして分離された磁性粒子は溶液中に再懸濁され、粒子懸濁液中の発光標識が活性化され、そして光放射が検出される請求項8の方法。

10. 第1および第2の結合試薬の各自は抗体またはその免疫反応性フラグメントである請求項6の方法。

11. 第1および第2の結合試薬の各自はモノクローナル抗体である請求項6の方法。

12. 第1および第2の結合試薬の各自は核酸である請求項6の方法。

13. 第2の結合試薬はビオチニル化され、そして第3の結合試薬はアビジンまたはストレプトアビジンである請求項6の方法。

14. 第2の結合試薬はビオチニル化され、そして第3の結合試薬はアビジンまたはストレプトアビジンである請求項10の方法。

15. 第2の結合試薬はビオチニル化され、そして第3の結合試薬はアビジンまたはストレプトアビジンである請求項12の方法。

16. 全血中の検体のための特異的結合アッセイを実施するためのキットであ

(4)

って、

(a) 検体へ特異的に結合する能力を有し、かつ発光タンパク、エクオリンで標識された第1の結合試薬、

(b) 検体へ特異的に結合する能力を有し、かつ固体支持体上に固定化された第3の結合試薬へ結合する能力を有する第2の結合試薬、

(c) 第2の結合試薬へ結合することができる第3の結合試薬を

その上に固定化した固体粒子、

を含んでいる前記キット。

17. 全血中の検体のための特異的結合アッセイを実施するためのキットであって、

(a) ルミネセンス発光タンパク、エクオリンで標識された標識した検体、

(b) 検体へ特異的に結合する能力を有し、かつ固体支持体上に固定化された第3の結合試薬へ結合する能力を有する第2の結合試薬、

(c) 第2の結合試薬へ結合することができる第3の結合試薬をその上に固定化した固体粒子、

を含んでいる前記キット。

18. 第1および第2の結合試薬の各自は抗体またはその免疫反応性フラグメントである請求項16または17のキット。

19. 抗体の少なくとも一方はモノクローナル抗体である請求項18のキット。

20. 第1および第2の結合試薬は核酸である請求項16または17のキット。

21. 第2の結合試薬はビオチニル化され、そして第3の結合試薬はアビジンまたはストレプトアビジンである請求項16または17のキット。

22. 固体粒子は磁性粒子である請求項16または17のキット。

23. 固体粒子は磁性粒子である請求項21のキット。

(5)

**【発明の詳細な説明】****発光特異的結合アッセイ****本発明の背景****1. 本発明の分野**

本発明は特異的結合アッセイを実施するための方法およびキットに関する。さらに詳しくは、本発明は、発光性物質、好ましくは発光タンパク、エクオリンが標識として採用される特異的結合アッセイに関する。

**2. 背景技術の説明**

特異的結合アッセイ方法は、ここでは“検体”と一般に呼称する広範囲の物質の定性的および定量的測定のために使用される。これら物質はタンパク、ウイルス、ウイルス抗原、バクテリア細胞、細胞表面受容体、酵素、ホルモン、ポリサッカライド、グリコタンパク、リポタンパクなどのような大きな複合体分子か、またはペプチド、ある種のホルモン、治療用薬物、乱用薬物などの小さいハプテン分子であり得る。

これらのアッセイは生物学的分子間で発生する特異的結合反応の利益を享受する。最も普通に使用される特異的結合反応は、抗体と抗原の間で発生する反応である。この場合は、特異的結合反応はイムノアッセイと呼称される。他の結合ペア間の反応も採用し得る。例えば、酵素と基質間、ホルモンと受容体、および核酸の相補ストランド間の相互作用がこの目的のために使用されている。アビジンとビオチン間および免疫グロブリンと免疫グロブリン結合タンパク

(例えばタンパク A およびタンパク G) 間の反応のような他の結合反応も特異的結合反応に有利に使用されている。

特異的結合アッセイは種々のフォーマットに組むことができる。例えば、そのようなアッセイは競合またはサンドイッチアッセイでよい。それらは均質または不均質アッセイでよく、そしてそれらは逐次的または同時でよい。特異的結合アッセイの大部分において、特異的結合アッセイに参加する結合ペアのメンバーの少なくとも一方は標識される。標識は反応生成物を検出しそして定量化するための手段を提供する。ラジオイムノアッセイは放射性同位元素を含有する結合ペア

(6)

メンバー（例えば抗原）を採用する。酵素イムノアッセイにおいては、結合ペアメンバーの一方は酵素で標識される。酵素は色変化のような検出し得る信号を発生する基質と反応する。

発光特異的結合アッセイは、化学発光または生物発光標識の種類の一つを利用する。そのようなアッセイの一つは標識として、エクオリンとして知られる発光タンパクを利用する。エクオリンは、クラゲ、*Aequorea victoria*の生物ルミネセンスに責任ある高アフィニティーカルシウムイオン結合タンパクである。天然エクオリンは、強く結合した腔腸動物ルシフェリンおよび酸素各1モルを含んでいる、MW 21,000ダルトンの単一ポリペプチド鎖よりなる発光タンパクである。この複合体はカルシウムイオンの不存在下安定であり、そして発光はエクオリン1モルあたり3モルのカルシウムイオンが結合した時開始される。カルシウムイオンの存在下において、エクオリンはルシフェリンのオキシルシフェリンへの酸化を触媒し、同時に約10秒持続する青色光（ $\lambda_{max} = 469 \text{ nm}$ ）のフラッシュを伴う。stults, et al

, Biochemistry, 31:1433-42 (1992) およびそれに引用されている参考文献を見よ。

エクオリンは*Aequorea*組織から単離することができる。加えて、それは組換えDNA技術によって製造することができる。Cormier, M. J. の米国特許No. 5,162,227およびZenno, S. et al., 米国特許No. 5,288,623を見よ。増強された生物発光性を有するアポエクオリンの修飾形も組換えDNA操作によって製造された。Prasher, D. 米国特許No. 5,360,728を見よ。ここで使用する術語“エクオリン”は、この発光タンパクの天然および組換え形のみならず、前述したPrasher特許に記載されたその修飾形をも含む。

特異的結合アッセイに標識として使用することができる他の発光タンパクが知られている。そのような発光タンパクはobelin, mnemiopsin, berovirin, pholasin, ルシフェラーゼおよび*Pelagia*, *Cypridina*および*octacod*から単離される発光タンパクを含む。

(7)

大部分の特異的結合アッセイは、生物学的に意義ある検体について血液および尿のような生物学的流体の分析のために仕組まれている。ある特異的結合アッセイの目標が全血中のある物質の存在を決定することである時、典型的にはサンプルはアッセイを妨害し得る細胞成分およびヘモグロビンを除去するように前処理されなければならない。特異的結合アッセイは通常全血の血清成分について実施される。代わりに、全血アッセイは細胞成分およびヘモグロビンからの妨害を最小にするため、特異的結合アッセイに先立って濾過ま

たは吸収を提供するように設計されている。例えば、Chen, F. M. の米国特許No. 5, 096, 809を見よ。ここで用語“血液”および“全血”は互換的に使用され、そして実質上血球、血漿、血清およびフィブリンを含むその成分の分離を達成するように処理されていない、体内の心脈管チャンネルを通して循環する均質な液体を意味すると定義される。

しばしば、特異的結合アッセイを全血に対して直接実施することが高度に望ましいであろう。前処理ステップから生ずるサンプルのロスが避けられるので、全血に対して直接実施されるアッセイには低いサンプル体積が必要である。さらに、もし前処理ステップが省かれるならば、実施すべきアッセイのための時間を最小にすることができる。救急室または手術室環境においては、特に小児患者の場合、これら要因は決定的に重要になり得る。

#### 本発明の概要

本発明によれば、発光特異的アッセイ法は、(a) 検体を含有もしくは含有する疑いある全血のサンプルを得るステップ、(b) サンプルを、検体へ結合することができ、かつ発光分子で標識された第1の結合試験と合併するステップ、(c) サンプルを、検体へ結合することができそして検体もしくは第1の試薬へ結合した検体と複合体を形成することができ、かつ固体支持体へ固定化された第2の結合試薬と接触させるステップ、(d) 第1の結合試薬と検体と第2の結合試薬の複合体をサンプルから除去するために固体支持体をサンプルから分離するステップ、(e) 固体支持体を含まないサンプル中の発光標識、または固体支持体へ結合した発光標識を活性化するステップ、および(f) 活性化した発光標識か



(8)

ら発する光を

検出することによってサンプル中の検体の存在を測定するステップを含んでいる。

特異的結合アッセイ方法の代替具体例は、第1の結合試薬が使用されない競合アッセイフォーマットを使用する。この具体例においては、全血サンプルは発光標識で標識した標識検体の既知量と合併される。標識したおよび未標識検体は固定化した第2の結合試薬に対して競合し、第2の結合試薬によって捕獲された標識検体の量はサンプル中に存在する未標識検体の量に反比例する。

特定の具体例においては、本発明の特異的結合アッセイは発光標識としてエクオリンを使用し、そして固体支持体として磁性粒子を使用する。

他の具体例において、本発明はここに記載したアッセイ方法において使用される試薬を含む発光アッセイキットに関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明によるアッセイ方法から得られた校正曲線を図示し、全血不含標準液と全血の存在下の両方におけるTSH濃度の関数としての発光を示している。

#### 本発明の詳細な説明

本発明の発光結合アッセイは、全血中の検体を前処理ステップなしで測定するために使用される。このアッセイは感受性であり、そしてサンプル体積が小さい時でさえ速いそして正確な結果を提供することができる。

この発光特異的結合アッセイは、サンドイッチもしくは競合フォーマットにおいて実施することができる不均質アッセイである。サンドイッチフォーマットにおいては、発光物質で標識された第1の

結合試薬例えば抗体と、そして捕獲試薬として役立つ第2の結合試薬を採用する。サンドイッチフォーマットにおいては、第1および第2の結合試薬は関心ある検体へ同時に結合することができる。第2の結合試薬は固定支持体上に固定化される。固定化は第2の結合試薬と固体支持体とを直接、または固体支持体上に固

(9)

定化された第3の結合試薬を介して結合することによって達成することができる。後者の具体例が使用される時は、第1および第2の結合試薬の検体との反応は固体支持体をサンプルへ導入する前に発生することができ、この場合はそれらの反応は溶液反応動力学に実質上従って挙動する。代わって、成分のすべてを同時に加えることができ、この場合は結合反応は同時に発生する。

第1および第2の結合試薬の検体との反応によって生成した複合体は、固体支持体をサンプル混合物から分離することによって未結合標識結合試薬から分離される。本発明の好ましい具体例においては、第2の結合試薬は磁性粒子上へ直接、または固定化された第3の結合試薬を介して間接的に固定化される。分離ステップはサンプルからの粒子の除去、またはルミネセンス発光の検出を許容するようにサンプル内の粒子の局在化を含むことができる。

固定化した複合体の分離もしくは単離後、発光標識は光を放出させるため活性化される。光の放出はサンプルから、または固体支持体へ固定化された複合体から、または両方から検出することができる。

標識した第1の結合試薬は、発光標識を結合試薬へ接合することによって調製される。結合試薬は、例えばポリクローナル、モノクローナルもしくは相補決定領域グラフト抗体、またはそれらの結合

フラグメント、例えばFab, Fab' もしくはF(ab')<sub>2</sub>, または合成1本鎖抗体でよい。代わって、結合試薬は核酸(RNAまたはDNA)または特異的結合反応に関与する他の分子、例えばホルモン、受容体、酵素、葉酸結合タンパクもしくは内因子のような結合タンパク、基質、タンパクAもしくはタンパクGのような免疫グロブリン結合タンパク等でもよい。第1の結合試薬は関心ある検体に対し結合親和力を有する。

競合アッセイフォーマットにおいては、第1の試薬は使用されない。関心ある検体と結合し得る固定化した第2の結合試薬は、サンプルもしくは校正標準液および発光分子で標識された検体の固定量と合併される。サンプルもしくは標準液中の検体は固定した方の結合試薬に対して標識した検体と競合する。固定化した第2の結合試薬へ結合した標識した検体の量はサンプルもしくは標準液中の検体

、第3の結合試薬に対する第2の結合試薬の親和性は種々の形を取ることができる。例えば、もし第2の結合試薬が免疫グロブリンであれば、固定化した第3の結合試薬はタンパクAもしくはタンパクGもしくは抗免疫グロブリン抗体でよい。代わって、第2の結合試薬は抗原またはハプテンに

対する抗体でよい。例えば第2の結合試薬をビオチニル化することができ、その場合第3の結合試薬はアビジンまたはストレプトアビジンである。反対に、第2の結合試薬をアビジンまたはストレプトアビジンへ結合することができ、その場合固定化された第3の結合試薬はビオチンである。ビオチンはアビジンまたはストレプトアビジンと強い非共有結合を形成する。抗体、タンパクおよび核酸のビオチニル化操作はこの分野において良く知られている。例えば、Huber E. et al., 米国特許No. 5, 521, 319およびCarriico, R. J. 米国特許No. 5, 200, 313を見よ。これらの開示をここに参照として取り入れる。

第2の結合試薬がその上に固定化される固体支持体は不均質イムノアッセイに使用するため既知の広範囲の固体支持体のどれでもよい。マイクロ粒子は、それらの高い表面積が捕獲ステップの効率および動力学を改善する故固体支持体として使用するのに好ましい。Craig, et al., 米国特許No. 4, 401, 765に開示されたタイプのラテックス粒子、およびBangs Laboratories, Inc. Fishers, IN, 46038-2886, USAから入手し得るような磁性粒子が好ましい。Cortex Biochem, San Leandro CAから入手し得るCortex粒子を代替具体例において使用することができる。ここに参照として取り入れる1987年4月28日発行の米国特許No. 4, 661, 408に記載されている安定化二酸化クロム粒子も使用することができる。これらの粒子およびそれらのイムノアッセイにおける使用は、ここに参照として取り入れるObzansky, D. M. 米国特許No. 5, 369, 006に記載さ

れている。Obzansky特許は二酸化クロム粒子の表面にストレプトアビジ

(12)

ンのような結合試薬を固定化するための操作を記載する。

磁性粒子は、混合および分離ステップが強い磁場の適用によって便利にそして速やかに達成できるので本発明の実施のために好ましい。例えば、このアッセイは、容器の反対側へ磁場を交替に適用することにより、磁性粒子を反応容器を横切って往復水泳させる時特に良好に機能することが判明した。溶液から複合体の分離に続いて、発光標識が活性化され、そして光の放射が検出される。固体支持体へ固定化された発光標識の、または固定支持体が分離された溶液の発光を測定することができる。サンプル中の検体の量は、放射された光のレベルを標準較正曲線と比較することによって定量化される。

本発明の特異的結合アッセイは広範囲の異なる態様に組むことができるが、好ましい具体例においては、第1の結合試薬は検体へ結合することができる、エクオリン標識モノクローナル抗体である。第2の結合試薬は、検体へ結合することができるビオチニル化モノクローナル抗体である。固体支持体は、Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, 46038-2886, USAからストックNo. C0008200RNとして入手し得るような、ストレプトアビジン被覆超常磁性マイクロスフェアである。反応は試験管またはマイクロタイターウエルのような容器中で実施することができる。反応は、全血もしくは較正液を、適当なバッファー溶液中の第1の結合試薬および第2の結合試薬の適量と合併することによって開始される。サンプルは免疫反応の生起

を許容するのに十分に長い時間インキュベートされる。次にストレプトアビジン被覆磁性粒子がサンプルへ添加され、そして混合物は攪拌され、免疫複合体の磁性粒子への結合を許容するようにインキュベートされる。粒子は磁場の適用によって分離され、洗浄および再懸濁される。発光エクオリン標識による光を放出させるため十分なカルシウムイオンが添加される。放出される光がルミネセンス検出器によって検出され、そして較正曲線との比較によって読みが検体の濃度に相関される。

当業者には、本発明の特異的結合アッセイは人力により実施することができ、または自動機器へ容易に適用化することができることが認められるであろう。試

薬の添加順序は、種々の結合反応が、記載した定性的または定量的測定を得ることができる点へ進行することが許容される限り、重要ではない。

本発明は、限定を意図しない以下の実施例によってさらに例証される。

#### 実施例 1

##### TSHのための生物発光アッセイ

塩化ナトリウム10mM, 塩化カリウム2.7mM, リン酸ナトリウム10mM, pH7.4を有し、塩化マグネシウム10mM, EGTA 10mM, アジ化ナトリウム0.1%およびウシ血清アルブミン(BSA)5%を添加したリン酸塩緩衝化食塩水(PBS)よりなるバッファーで、スチレンマイクロタイタープレートウェルを一夜室温で前浸漬した。マイクロタイタープレートウェルを使用前水切りし、空気乾燥した。マイクロタイターウェルへかきまぜながら以下を加えた。TSH 21mIU/Lを含有するTSH較

正液0.1mL, TSHに対するビオチニル化マウスモノクローナル抗体(Boehringer Mannheim, Indeanapolis, IN, USA, カタログNo. 1367978 (クローンA8TSH) 50ナノグラム、およびTSHに対するエクオリン標識モノクローナル抗体9ナノグラム(Sea Lite Science, Inc. Norcross, GA, USAから得たロットNo. 46-145, バッファー(塩化カリウム1M, トリス10mM, pH7.5, 塩化マグネシウム10mM, EGTA 10mMアジ化ナトリウム0.1%, およびBSA0.1%を含む)20 $\mu$ l中、OEM Concepts Inc. Toms River, NJから得たクローン057-11003から調製したTSHに対するマウスモノクローナル抗体へ接合することにより調製した)。溶液を37℃で15分間インキュベートした。0.1% BSAおよび0.1% Triton X-100を添加したPBS中のストレプトアビジン被覆超常磁性マイクロフエア(Bangs Laboratories, Inc. Fishers, IN, USA, スtockコードC0008200RN)20マイクロリットル(22.5マイクログラム)をかきまぜながら溶液へ添加した。混合物を37℃で5分間インキュベートした。次に粒子を四極磁場の適用

(14)

により分離した。粒子を、塩化マグネシウム10mM, EGTA 10mM, アジ化ナトリウム0.1%, Tween200.05%を含むPBS, pH7.4の100 $\mu$ Lで4回洗浄し、同じバッファー100 $\mu$ L中に再懸濁した。0.1M  $\text{CaCl}_2$ の100 $\mu$ Lをかきまぜながら粒子中へ注入した。Dynatech ML 3000ミネセンス検出器を用いて光放射を10秒間

測定した。

上の操作を追加の校正溶液、全血サンプルおよび1.5および21mIU/Lの濃度でTSHをスパイクしたスパイク全血サンプルについて繰り返した。ルミネセンス検知器からの読みをTSH濃度に対してプロットし、そして応答は試験した範囲を通じて直線状であることが見られた。データを下の表1に示し、そして得られる校正曲線はエクオリン応答が全血および校正液中のTSH濃度の関数として提供される図1に示されている。校正液とスパイクした全血値間の差は、全血サンプル中の正常内因性TSH1.3mIU/Lによるものである。

表 1

TSH $\mu$ IU/mL	0	1	5	21
ルミネセンスカウント				
校正液	1934	28141	101307	390408
	2121	38324	81215	344986
	1796	27716	89634	310261
平均	1941	31394	90719	348552
標準偏差	176	6005	10089	40192
% CV	9.1	19.1	11.1	11.5
全血	37643	65008	113649	306018
	37933	63562	98674	435896
	42230	59760	119011	376953
平均	39269	62777	110445	379560
標準偏差	2568	2710	10540	65031
% CV	6.5	4.3	9.5	17.4

## 実施例2

(15)

クレアチンキナーゼ、MBアイソザイム (CKMB) のための生物発光アッセイ

実施例1に類似したやり方で、塩化ナトリウム120mM、塩化カリウム2.7mM、リン酸ナトリウム10mM、pH7.4を有し、塩化マグネシウム10mM、EGTA10mM、アジ化ナトリウム0.1%およびウシ血清アルブミン(BSA)5%を添加したリン酸塩緩衝化食塩水(PBS)よりなるバッファでスチレンマイクロタイタープレートウエルを一夜室温で前浸漬した。マイクロタイタープレートウエルは使用前水切りし、空気乾燥した。マイクロタイターウエルへかきまぜながら以下を加えた。CKMB 329ng/mLを含むCKMB校正液25 $\mu$ L、CKMBに対するビオチニル化マウスモノクローナル抗体100ng (Dade Chemistry Systems, Inc. 部品No. 735322.312) およびCKMBに対するモノクローナル抗体のエクオリン標識F(ab')<sub>2</sub>フラグメント20ng (Dade Chemistry Systems, Inc. 部品No. 735322.305) (塩化マグネシウム10mM、EGTA 10mMおよび0.05%Tween20を添加した、塩化カリウム1M、トリス10mM、pH7.5、塩化マグネシウム10mM、EGTA 10mM、アジ化ナトリウム0.1%およびPBS 80mLのバッファ20 $\mu$ L中) この溶液を37℃で5分間インキュベートした。0.1%BSAおよび0.05%TritonX100を添加したPBS中のストレプトアビジン被覆超常磁性マイクロスフェア (Bangs Laboratories, Inc. Fisher

s, IN, USA, スtockコードC0009000RN) の20 $\mu$ L (22.5 $\mu$ g) をかきまぜながら溶液へ加えた。混合物を37℃で5分間インキュベートした。次に四極磁場の適用によって粒子を分離した。PBS pH7.4、塩化マグネシウム10mM、EGTA 10mM、0.1%アジ化ナトリウム、および0.05%Tween20を含有する洗浄バッファの100 $\mu$ Lで粒子を4回洗った。粒子を次に同じバッファの100 $\mu$ Lに再懸濁した。塩化カルシウム0.1Mの100 $\mu$ Lを粒子懸濁液へかきまぜながら注入した。Dynatech ML 3000ルミネセンス検出器を用いて光放射を10秒間測定した

(16)

。上の操作を全血（EDTA含有真空採取チューブ中）25  $\mu$ Lを加えて繰り返した。この操作を再び上の全血添加有り無しのCKMB 0 ng/mLを含有する追加の校正液について繰り返した。データを以下の表2に示す。

MCKMB ng/mL	表 2	
	0	329
	ルミネセンスカウント	
校正液	263	133514
	321	132782
	836	117215
平均	473	127837
標準偏差	315	9206
%CV	66.6	7.2
全血	591	126315
	475	120287
	298	107301
平均	591	126315
標準偏差	147	9716
%CV	32.5	8.2



(17)

【図1】

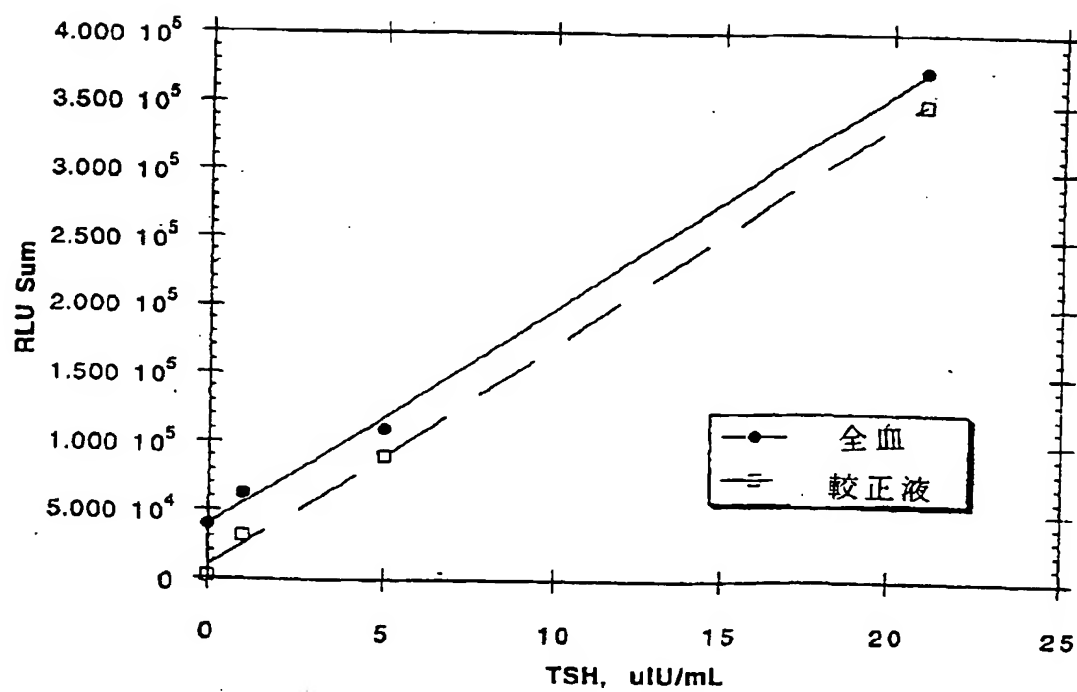


FIG. 1

(19)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 98/00247

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4 661 408 A (LAU HON-PENG P ET AL) 29 April 1987 cited in the application see column 1, line 6 - column 1, line 10 see column 3, line 15 - column 3, line 25 see column 3, line 58 - column 3, line 65 ---	1-3,8,9, 16,17, 22,23
Y	EP 0 137 515 A (UNIV GEORGIA) 17 April 1985  see the whole document ---	1,2,5-7, 10-12, 16-20
Y	EP 0 372 352 A (CHISSO CORP) 27 November 1989  see page 2, line 34 - page 2, line 45 see page 3, line 33 - page 3, line 34 see page 4, line 56 - page 5, line 25; claims ---	1,2,5,7, 10-12, 16,17,20
Y	US 5 521 319 A (HUBER ERASMUS ET AL) 28 May 1996 see the whole document ---	13-15,21
A	US 5 200 313 A (CARRICO ROBERT J) 6 April 1993 see column 1, line 46 - column 2, line 61 ---	13-15,21
A	WO 89 11102 A (ANGENICS INC) 16 November 1989  see claims; figures ---	1-3,8, 16,17, 22,23
A	WO 93 19366 A (DIATRON CORP) 30 September 1993 see claim 1 ---	1
A,P	EP 0 768 530 A (NIPPON PAINT CO LTD) 16 April 1997 see the whole document ---	1-22
A	EP 0 724 156 A (NIPPON PAINT CO LTD) 31 July 1996 see the whole document -----	1-22

(20)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 98/80247

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5486455 A	23-01-96	US 5648218 A	15-07-97
		AU 5171894 A	29-08-94
		EP 0683822 A	29-11-95
		JP 8506897 T	23-07-96
		MX 9401112 A	31-08-94
		WO 9418342 A	18-08-94
US 4661408 A	28-04-87	CA 1289873 A	01-10-91
		DE 3776180 A	05-03-92
		DK 136787 A	19-09-87
		EP 0240770 A	14-10-87
		IE 60178 B	15-06-94
		JP 1773233 C	14-07-93
		JP 4063813 B	13-10-92
		JP 62226817 A	05-10-87
EP 0137515 A	17-04-85	AU 590511 B	09-11-89
		AU 3420384 A	18-04-85
		CA 1234756 A	05-04-88
		DK 487784 A	14-04-85
		FI 844017 A	14-04-85
		JP 61022254 A	30-01-86
EP 0372352 A	13-06-90	JP 2250900 A	08-10-90
		JP 2253162 A	11-10-90
		JP 2154688 A	14-06-90
		DE 68922971 D	13-07-95
		DE 68922971 T	19-10-95
US 5521319 A	28-05-96	DE 4302241 A	28-07-94
		WO 9417072 A	04-08-94
		EP 0632810 A	11-01-95
		JP 2604993 B	30-04-97
		JP 7502045 T	02-03-95
US 5200313 A	06-04-93	AU 3138784 A	07-02-85
		CA 1231303 A	12-01-88
		EP 0133671 A	06-03-85
		JP 60100056 A	03-06-85
		AU 587188 B	10-08-89

(21)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 98/00247

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5200313 A		AU 4259785 A	05-12-85
		CA 1253777 A	09-05-89
		DE 3586659 A	22-10-92
		DE 3586659 A	22-10-92
		DK 242685 A,B,	02-12-85
		EP 0163220 A	04-12-85
		EP 0339686 A	02-11-89
		EP 0336454 A	11-10-89
		FI 852160 A	02-12-85
		JP 1830339 C	15-03-94
		JP 5031109 B	11-05-93
		JP 60262055 A	25-12-85
		JP 2043440 C	09-04-96
		JP 5168472 A	02-07-93
		JP 7068280 B	26-07-95
		US 4833084 A	23-05-89
WO 8911102 A	16-11-89	CA 1332148 A	27-09-94
		EP 0413758 A	27-02-91
		JP 5504828 T	22-07-93
		US 5145784 A	08-09-92
WO 9319366 A	30-09-93	CA 2132708 A	30-09-93
		EP 0632893 A	11-01-95
EP 0768530 A	16-04-97	NONE	
EP 0724156 A	31-07-96	AU 4213396 A	01-08-96
		CA 2168156 A	27-07-96
		JP 8262024 A	11-10-96

corr. to JP 2000-501075

**PCT**

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b>  <b>G01N 33/58</b>	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 98/30908</b>  <b>(43) International Publication Date:</b> 16 July 1998 (16.07.98)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US98/00247 <b>(22) International Filing Date:</b> 6 January 1998 (06.01.98)  <b>(30) Priority Data:</b> 08/780,307      8 January 1997 (08.01.97)      US  <b>(71) Applicant:</b> DADE BEHRING INC. [US/US]; 1717 Deerfield Road, Deerfield, IL 60015 (US). <b>(72) Inventors:</b> PANKRATZ, Thomas, John; 257 North Star Road, Newark, DE 19711 (US). STOUT, Richard, Wayne; 1308 Grinnell Road, Wilmington, DE 19803 (US). <b>(74) Agents:</b> RUSZALA, Lois, K. et al.; Dade Behring Inc., 1717 Deerfield Road, Deerfield, IL 60015 (US).		<b>(81) Designated States:</b> AU, BR, CN, JP, RU, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i>
<b>(54) Title:</b> LUMINESCENT SPECIFIC BINDING ASSAY  <b>(57) Abstract</b>  <p>A luminescent specific binding assay method for detecting an analyte in whole blood. The assay is a heterogeneous sandwich or competitive assay in which a first binding reagent is labeled with a luminescent photoprotein and an immobilized second binding reagent serves as a capture reagent. The luminescent photoprotein, upon activation, emits light which may be detected by a luminescence detector. The assay is rapid, sensitive and may be performed on small sample volumes.</p>		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece		Republic of Macedonia	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon		Republic of Korea	PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

- 1 -

TITLE OF THE INVENTION  
LUMINESCENT SPECIFIC BINDING ASSAY

## BACKGROUND OF THE INVENTION

5

1. Field of the Invention

This invention relates to methods and kits for performing specific binding assays. More particularly, the invention relates to a specific binding assay in which a luminescent substance, preferably the photoprotein, aequorin, is employed as a label. The luminescent specific binding assay of this invention is useful for determining the presence of various analytes in whole blood.

10

2. Description of the Background Art

Specific binding assay methods are used for quantitative and qualitative determinations of a wide variety of substances, generally referred to herein as "analytes." These substances may be large complex molecules, such as proteins, viruses, viral antigens, bacterial cells, cell surface receptors, enzymes, hormones, polysaccharides, glycoproteins, lipoproteins and the like, or small haptenic molecules, such as peptides, certain hormones, therapeutic drugs, drugs of abuse and the like.

15

These assays take advantage of specific binding reactions that occur between biological molecules. The specific binding reaction most commonly used is that which occurs between an antibody and an antigen. In that case, the specific binding assay is referred to as an immunoassay. Reactions between other binding pairs may also be employed. For example, interactions between enzymes and substrates, between hormones and receptors, and between complementary strands of nucleic acids, have been used for this purpose. Other binding reactions, such as those between avidin and biotin and between immunoglobulins and immunoglobulin binding proteins (e.g., Protein A and Protein G) have also been used advantageously in specific binding assays.

25

30

- 2 -

Specific binding assays may be configured in a variety of formats. For example, such assays may be competitive or sandwich assays. They may be homogeneous or heterogenous, and they may be sequential or simultaneous. In most specific binding assays, at least one of the members of the binding pair that participate in the specific binding reaction is labeled. The label provides a means for detecting and quantifying the reaction product. Radioimmunoassays employ a binding pair member (e.g., an antigen) that contains a radioactive isotope. In enzyme immunoassays, one of the binding pair members is labeled with an enzyme. The enzyme may, in turn, react with a substrate that produces a detectable signal, such as a color change.

Luminescent specific binding assays utilize any of a variety of chemiluminescent and bioluminescent labels. One such assay utilizes a photoprotein, known as aequorin, as the label. Aequorin is a high-affinity calcium ion-binding protein responsible for the bioluminescence of the jellyfish, *Aequorea victoria*. Native aequorin is a photoprotein consisting of a single polypeptide chain of MW 21,000 daltons, containing one mole each of tightly bound coelenterate luciferin and oxygen. This complex is stable in the absence of calcium ions, and light emission is initiated upon the binding of three moles of calcium ions per mole of aequorin. In the presence of calcium ions, aequorin catalyzes the oxidation of luciferin to oxyluciferin with a concomitant flash of blue light ( $\lambda_{\max}=469$  nm) which persists for approximately ten seconds. See, Stults, N.L. et al., Biochemistry, 31, 1433-42 (1992) and references cited therein.

Aequorin can be isolated from *Aequorea* tissue. In addition, it can be produced by recombinant DNA techniques. See Cormier, M.J., U.S. Patent 5,162,227 and Zenno. S. et al., U.S. Patent 5,288,623. Modified forms of apoaequorin having enhanced bioluminescence properties have also been produced by recombinant DNA procedures. See Prasher, D., U.S. Patent 5,360,728. As used herein, the term "aequorin" includes the native and recombinant forms of the photoprotein, as well as its modified forms as described in the aforementioned Prasher patent.



- 3 -

Other photoproteins are known that can be used as labels in specific binding assays. Such photoproteins include obeln, mnemiopsin, berovin, pholasin, luciferases and photoproteins isolated from Pelagia, Cypridina and ostracods.

5 Most specific binding assays are designed for analyzing biological fluids, such as blood or urine, for analytes of biological significance. When the goal of a specific binding assay is to determine the presence of a substance in whole blood, typically the sample must be pretreated to remove cellular components and hemoglobin, which can interfere with the assay. Specific binding assays are  
10 usually performed on the serum component of whole blood. Alternatively, whole blood assays have been designed to provide for a filtration or absorption step preceding the specific binding assay to minimize interference from cellular components and hemoglobin. See, e.g., Chen, F. M., U.S. Patent 5,096,809. Herein, the terms "blood" and "whole blood" are used interchangeably and are  
15 defined to mean a homogeneous liquid that circulates through the body's cardiovascular channels that has not been treated to achieve any separation of its components, these components essentially comprising corpuscles, plasma, serum, and fibrin.

Often, it would be highly desirable to perform a specific binding assay  
20 directly on whole blood. Lower sample volumes are needed for assays performed directly on whole blood, because sample losses resulting from pretreatment steps are avoided. Moreover, the time for an assay to be conducted can be minimized if pretreatment steps are eliminated. In emergency room or operating room environments, particularly involving pediatric patients, these  
25 factors can be of critical importance.

## SUMMARY OF THE INVENTION

30 In accordance with this invention, a luminescent specific binding assay method involves the steps of (a) obtaining a sample of whole blood which

- 4 -

contains or is suspected of containing an analyte, (b) combining with the sample a first binding reagent that is capable of binding to the analyte, said first binding reagent being labeled with a luminescent molecule, (c) contacting the sample with a second binding reagent that is capable of binding to the analyte and forming a complex with the analyte or the analyte bound to the first binding reagent, said second binding reagent being immobilized on a solid support; (d) separating the solid support from the sample so as to remove from the sample the complex of the first binding reagent, the analyte and the second binding reagent; (e) activating the luminescent label in the solid support-free sample or the luminescent label that bound to the solid support; and (f) determining the presence of analyte in the sample by detecting the light emitted from the activated luminescent label.

An alternative embodiment of the specific binding assay method utilizes a competitive assay format in which the first binding reagent is not used. In this embodiment, the whole blood sample is combined with a known amount of labeled analyte which has been labeled with a luminescent label. Labeled and unlabeled analyte compete with the immobilized second binding reagent, and the amount of labeled analyte that is captured by the second binding reagent is inversely proportional to the amount of unlabeled analyte present in the sample.

In a particular embodiment, the specific binding assays of this invention utilize aequorin as the luminescent label and utilize magnetic particles as the solid support.

In another embodiment, the invention relates to luminescent assay kits which contain reagents employed in the assay methods described herein.

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 depicts calibration curves resulting from an assay method according to this invention showing the light emission as a function of TSH concentration in both whole blood-free standard solutions and in the presence of whole blood.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5       The luminescent binding assay method of this invention is used for the determination of analytes in whole blood samples without pretreatment steps. The assay is sensitive and can provide rapid and accurate results, even when sample volumes are small.

10       The luminescent specific binding assay is a heterogeneous assay that may be conducted in the sandwich or competitive format. In the sandwich format, it employs a first binding reagent, e.g., an antibody, that has been labeled with a luminescent substance and a second binding reagent, e.g., a second antibody, that serves as a capture reagent. In the sandwich format, both the first and second binding reagents are capable of binding simultaneously to the analyte of interest.

15       The second binding reagent is immobilized on a solid support. The immobilization may be accomplished by bonding the second binding reagent and the solid support either directly or through a third binding reagent that is immobilized on the solid support. When the latter embodiment is employed, the reactions of the first and second binding reagents with the analyte may occur

20       before the solid support is introduced to the sample, in which case, those reactions behave substantially in accordance with solution reaction kinetics. Alternatively, all of the components may be added at the same time, in which case the binding reactions occur simultaneously.

25       The complex formed by the reaction of the first and second binding reagents with the analyte is separated from unbound labeled binding reagent by separating the solid support from the sample mixture. In a preferred embodiment of this invention, the second binding reagent is immobilized on magnetic particles, either directly or indirectly through an immobilized third binding reagent. The separation step may involve either removal of the particles

30       from the sample or localization of the particles within the sample to allow the detection of luminescence.

- 6 -

After separation or isolation of the immobilized complex, the luminescent label is activated to cause the emission of light. Light emission may be detected either from the sample or from the complex immobilized on the solid support or both.

5       The labeled first binding reagent is prepared by conjugating a luminescent label to a binding reagent. The binding reagent may, for example, be a polyclonal, monoclonal or complementary determining region-grafted antibody or a binding fragment thereof, e.g., Fab, Fab' or F(ab')<sub>2</sub> fragment, or a synthetic single-chain antibody. Alternatively, the binding reagent may be a nucleic acid  
10 (RNA or DNA) strand or other molecule that participates in a specific binding reaction, e.g., a hormone, a receptor, an enzyme, a binding protein such as folate binding protein or intrinsic factor, a substrate, an immunoglobulin binding protein, such as protein A or protein G, and the like. The first binding reagent has a binding affinity for the analyte of interest.

15       In the competitive assay format, the first binding reagent is not used. The immobilized second binding reagent which is capable of binding with the analyte of interest is combined with the sample or calibration standard and a fixed amount of analyte that has been labeled with a luminescent molecule. Unlabeled analyte in the sample or standard competes with labeled analyte for the  
20 immobilized binding reagent. The amount of labeled analyte that binds to the immobilized binding reagent is inversely proportional to the amount of analyte in the sample or standard. As in the sandwich format, the second binding reagent may be bound directly to the solid support or may be capable of binding to a third binding reagent that is immobilized on the solid support as described  
25 above.

The luminescent label which is conjugated to the first binding reagent (or the analyte, in the case of a competitive assay format) may be any luminescent compound that retains its ability to emit light when conjugated to a binding reagent. The preferred luminescent label is aequorin. When exposed to calcium  
30 ion, aequorin emits blue light with a high quantum yield at a wavelength where

- 7 -

the absorbance by whole blood is relatively low. The use of aequorin as the luminescent label permits the design of sensitive whole blood assays.

The aequorin used in the present invention may be native aequorin isolated from jellyfish tissue or may be recombinant (synthetic) aequorin. In addition, it may be a modified aequorin having enhanced bioluminescent properties.

Aequorin can be conjugated to antibodies, nucleic acids, various analytes and other binding reagents without substantially interfering with the luminescence characteristics of the compound. Procedures for conjugating aequorin and related photoproteins to binding reagents are described by Stults, M.L., U.S. Patent 5,486,455, the disclosure of which is incorporated herein by reference. Other conjugation procedures known to those skilled in the art also may be used.

In addition to aequorin, other luminescent labels that may be employed in the luminescent specific binding assay of the present invention include other photoproteins, such as obelin, mnemiopsin, berovin, pholasin, luciferases, and photoproteins isolated from Pelagia, Cypridina and ostracods and non-proteinaceous luminescent compounds, such as 2,3-dihydro-1,4-phthalalinediones, acridinium ester, acridinium sulfonamide, luciferins, luminol, 1-2-dioxetanes, cyclic hydrazides, europium chelates and phenol derivatives.

As discussed above, in either the sandwich or competitive format, the second binding reagent may be immobilized on a solid support either through a direct bond or through an affinity for an immobilized third binding reagent. In the latter embodiment, the affinity of the second binding reagent for the third binding reagent may take any of a variety of forms. For example, if the second binding reagent is an immunoglobulin, the immobilized third binding reagent may be an immunoglobulin binding protein, such as Protein A or Protein G or an anti-immunoglobulin antibody. Alternatively, the second binding reagent may be labeled with an antigen or hapten and the third binding reagent may be an antibody to that antigen or hapten. For example, the second binding reagent may

- 8 -

be biotinylated in which case the immobilized third binding reagent then is avidin or streptavidin. Conversely, the second binding reagent may be conjugated with avidin or streptavidin in which case the immobilized third binding reagent is biotin. Biotin forms a strong, non-covalent bond with avidin or streptavidin. Procedures for biotinylating antibodies, proteins and nucleic acids are well-known in the art. See, e.g., Huber E. et al., U.S. Patent 5,521,319 and Carrico, R.J., U.S. Patent 5,200,313, the disclosures of which are incorporated herein by reference.

The solid support on which the second binding reagent is immobilized may be any of the wide variety of solid supports known for use in heterogenous immunoassays. Microparticles are preferred for use as the solid support, because their high surface area improves the efficiency and kinetics of the capture step. Latex particles of the type disclosed by Craig, et al., U.S. Patent 4,401,765 and magnetic particles, such as those available from Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, 46038-2886, USA, are preferred. Cortex particles, available from Cortex Biochem, San Leandro, CA, may be used in an alternative embodiment. Stabilized chromium dioxide particles described in U.S. Patent 4,661,408 issued April 28, 1987, incorporated herein by reference, may also be used. These particles, and their use in immunoassays are described by Obzansky, D.M., U.S. Patent 5,369,006, incorporated herein by reference. The Obzansky patent describes procedures for immobilizing binding reagents, such as streptavidin on the surface of the chromium dioxide particles.

Magnetic particles are preferred for the practice of this invention, because mixing and separation steps can be conveniently and rapidly accomplished by application of a strong magnetic field. For example, it has been found that the present assay functions particularly well when magnetic particles are caused to "swim" back and forth across a reaction vessel by alternately applying a magnetic field to opposite sides of the vessel. Following separation of the complex from the solution, the luminescent label is activated and the light emission is detected. Light emission either of the luminescent label immobilized on the solid support or of the solution from which the solid support has been separated may be

- 9 -

measured. The amount of analyte in the sample can be quantified by comparing the level of emitted light to a standard calibration curve.

While the specific binding assay of this invention may be formatted in a variety of different ways, in a preferred embodiment, the first binding reagent is an aequorin-labeled monoclonal antibody that is capable of binding to the analyte. The second binding reagent is a biotinylated monoclonal antibody that is capable of binding to the analyte. The solid support is preferably streptavidin-coated superparamagnetic microspheres, such as those available from Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, 46038-2886, USA under the stock no. C0008200RN. The reaction can be performed in a vessel such as a test tube or a microtiter well. The reaction is initiated by combining a whole blood sample or calibrator with appropriate amounts of the first binding reagent and the second binding reagent in a suitable buffer solution. The sample is incubated for a sufficient length of time to permit the immunoreaction to occur. The streptavidin-coated magnetic particles are then added to the sample, and the mixture is agitated and incubated to allow binding of the immunocomplex to the magnetic particles. The particles are separated by application of a magnetic field, washed and resuspended. Sufficient calcium ions are added to cause the emission of light by the luminescent aequorin label. The light emitted is detected by a luminescence detector, and the reading is correlated to the concentration of the analyte by comparison to a calibration curve.

It will be appreciated by those skilled in the art that the specific binding assay of this invention may be performed manually or is readily adaptable to automated equipment. The order of addition of reagents is not critical, provided that the various binding reactions are allowed to proceed to a point that a qualitative or quantitative measurement, as desired, can be obtained.

The invention is further illustrated by the following examples, which are not intended to be limiting.

Example 1Bioluminescent Assay for TSH

Styrene microtiter plate wells were pre-soaked overnight at room temperature with a buffer composed of phosphate-buffered saline ("PBS") having  
5 140 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride, 10 mM sodium phosphate, pH 7.4 with added 10 mM magnesium chloride, 10 mM EGTA, 0.1% sodium azide and 5% bovine serum albumin ("BSA"). The microtiter plate wells were drained and air-dried before use. The following was added with mixing to a microtiter well: 0.1 ML of a TSH calibrator containing 21 mIU/L TSH, 50  
10 nanograms of biotinylated mouse monoclonal antibody to TSH (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA, cat. No. 1367978 (clone A8TSH)) and 9 nanograms of aequorin labeled monoclonal antibody to TSH (obtained from SeaLite Sciences, Inc. Norcross, GA, USA, lot. no. 46-145, prepared by conjugating aequorin to a mouse monoclonal antibody to TSH produced from clone 057-11003  
15 obtained from OEM Concepts Inc., (Toms River, N.J.) in 20 µl of buffer (1M potassium chloride 10 mM tris, pH 7.5, 10 mM magnesium chloride, 10 mM EGTA, 0.1% sodium azide, and containing 0.1% BSA). This solution was incubated at 37 C for 15 minutes. Twenty microliters (22.5 microgram) of streptavidin coated superparamagnetic microspheres (Bangs Laboratories, Inc.,  
20 Fishers, IN, USA, stock code C0008200RN) in PBS with added 0.1% BSA and 0.1% Triton X-100 were then added to the solution with mixing. The mixture was incubated at 37 C for 5 minutes. The particles were then separated by application of a quadrupole magnetic field. The particles were washed four times with 100 microliters of a wash buffer containing PBS pH 7.4, 10 mM magnesium chloride,  
25 10 mM EGTA, 0.1% sodium azide and 0.05% Tween 20. The particles were then resuspended in 100 microliters of the same wash buffer. One hundred microliters of 0.1 M CaCl<sub>2</sub> was injected into the particle suspension with mixing. Light emission was measured for ten seconds using a Dynatech ML 3000 luminescence detector.

30 The foregoing procedure was repeated with additional calibrator solutions, whole blood samples, and spiked whole blood samples spiked with TSH



- 11 -

concentrations of 1, 5 and 21 mIU/L. The reading from the luminescence detector was plotted against TSH concentration and the response was found to be linear throughout the range that was tested. The data are set forth in Table I below and the resulting calibration curves are shown in Figure 1 where aequorin response is provided as a function of TSH concentration in whole blood and calibrator. The difference between the calibrator and spiked whole blood values are due to endogenous normal TSH in the whole blood sample of 1.3 mIU/L.

Table 1

TSH $\mu$ IU/mL	0	1	5	21
	<u>Luminescence Counts</u>			
Calibrator:	1934	28141	101307	390408
	2121	38324	81215	344986
	1796	27716	89634	310261
Mean:	1941	31394	90719	348552
Std. Dev.:	176	6005	10089	40192
%CV:	9.1	19.1	11.1	11.5
Whole Blood:	37643	65008	113649	306018
	37933	63562	98674	435896
	42230	59760	119011	376953
Mean:	39269	62777	110445	37956
Std. Dev.:	2568	2710	10540	65031
%CV:	6.5	4.3	9.5	17.4

Example 2

Bioluminescence Assay for

Creatine Kinase, MB Isoenzyme (CKMB)

In a similar manner to Example 1, styrene microtiter plate wells were pre-soaked overnight at room temperature with a buffer composed of phosphate-buffered saline ("PBS") having 120 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium

- 12 -

chloride, 10 mM sodium phosphate, pH 7.4, with added 10 mM magnesium chloride, 10 mM EGTA, 0.1% sodium azide and 5% bovine serum albumin ("BSA"). The microtiter plate wells were drained and air-dried before use. The following was added with mixing to a microtiter well: 25 microliters of a CKMB

5 calibrator containing 329 ng/mL CKMB, 100 nanograms of biotinylated mouse monoclonal antibody to CKMB (Dade Chemistry Systems Inc. part number 735322.312) and 20 nanograms of aequorin labeled F(ab')<sub>2</sub> fragment of a monoclonal antibody to CKMB (Dade Chemistry Systems Inc. part number 735322.305) in 20 microliters of buffer (1M potassium chloride, 10 mM tris, pH 7.5,

10 10 mM magnesium chloride, 10 mM EGTA, 0.1% sodium azide, 0.1% BSA, and 80mL of PBS with added 10mM magnesium chloride, 10 mM EGTA, and 0.05% Tween 20. This solution was incubated at 37°C for 15 minutes. Twenty microliters (22.5 microgram) of streptavidin coated superparamagnetic microspheres (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, USA, stock code

15 C0009000RN) in PBS with added 0.1% BSA and 0.05% Triton X-100 were then added to the solution with mixing. The mixture was incubated at 37°C for 5 minutes. The particles were then separated by application of a quadrupole magnetic field. The particles were washed four times with 100 microliters of a wash buffer containing PBS pH 7.4, 10 mM magnesium chloride, 10 mM EGTA,

20 0.1% sodium azide and 0.05% Tween 20. The particles were then resuspended in 100 microliters of the same wash buffer. One hundred microliters of 0.1 M calcium chloride was injected into the particle suspension with mixing. Light emission was measured for ten seconds using a Dynatech ML 3000 luminescence detector. The foregoing procedure was repeated with the addition of 25uL whole

25 blood (collected in an EDTA-containing vacuum collection tube). The procedure was repeated again with an additional calibrator containing 0 ng/mL CKMB, with and without added whole blood as above. The data are set forth in Table 2 below.

- 13 -

Table 2

MCKMB ng/mL:		0	329
5		<u>Luminescence Counts</u>	
	Calibrator:	263	133514
		321	132782
		836	117215
10	Mean:	473	127837
	Std. Dev.:	315	9206
	% CV:	66.6	7.2
	Whole Blood:	591	126315
15		475	120287
		298	107301
	Mean:	591	126315
	Std. Dev.:	147	9716
20	% CV:	32.5	8.2

## CLAIMS

1. A heterogenous luminescent specific binding assay method in whole blood, which comprises

- 5 (a) obtaining a sample of whole blood which contains or is suspected of containing an analyte;
- (b) combining with the sample a first binding reagent that is capable of binding to the analyte, said first binding reagent being labeled with a luminescent photoprotein which, upon activation, emits light;
- (c) contacting the sample with a second binding reagent that is 10 capable of binding to the analyte, said second binding reagent being immobilized on a solid support;
- (d) allowing said first and second binding reagents to react with analyte present in the sample under binding conditions to produce a complex;
- (e) separating the complex from the sample by separating the solid 15 support from the sample;
- (f) activating the luminescent photoprotein label in the solid support-free sample or in the complex that bound to the solid support; and
- (g) determining the presence of analyte in the sample by detecting the light emitted from the activated luminescent photoprotein label.

20

2. A heterogeneous specific binding assay method in whole blood, which comprises

- (a) obtaining a sample of whole blood which contains or is suspected of containing an analyte;
- 25 (b) combining with said sample a known quantity of the analyte which has been labeled with a luminescent photoprotein which, upon activation, emits light;
- (c) contacting the sample with a second binding reagent that is capable of binding to the analyte, said binding reagent being immobilized on a 30 solid support;

- 15 -

(d) allowing said second binding reagent to react with the labeled and unlabeled analyte to produce complexes;

(e) separating the complexes from the sample by separating the solid support from the sample;

5 (f) activating the luminescent photoprotein label in the solid support-free sample or in the complex that bound to the solid support; and

(g) correlating the light emission from the sample with the presence of analyte in the sample.

3. The method of claim 1 or 2, wherein the second binding reagent is  
10 bound directly to the solid support.

4. The method of claim 1 or 2, wherein the second binding reagent has the capability of binding both the analyte and a third binding reagent that is immobilized on the solid support, the assay method further comprising contacting the sample with the solid support that has immobilized thereon the  
15 third binding reagent.

5. The method of claim 1 or 2, in which the luminescent photoprotein is aequorin.

6. The method of claim 4, in which the photoprotein is aequorin.

7. The method of claim 6, in which the aequorin label is activated to emit  
20 light by the addition of an activating-amount of calcium ions.

8. The method of claim 6, in which the solid support comprises magnetic microparticles.

9. The method of claim 8, in which the separation defined in step (e) is achieved by application of a magnetic field, and the separated magnetic particles  
25 are resuspended in a solution, the luminescent label in the particle suspension is activated, and light emission is detected.

10. The method of claim 6 in which each of the first and second binding reagents is an antibody or an immunoreactive fragment thereof.

11. The method of claim 6, in which each of the first and second binding  
30 reagents is a monoclonal antibody.

12. The method of claim 6, in which each of the first and second binding reagents is a nucleic acid.

13. The method of claim 6, in which the second binding reagent is biotinylated and the third binding reagent is avidin or streptavidin.

5 14. The method of claim 10, in which the second binding reagent is biotinylated and the third binding reagent is avidin or streptavidin.

15. The method of claim 12, in which the second binding reagent is biotinylated and the third binding reagent is avidin or streptavidin.

10 16. A kit for performing a specific binding assay for an analyte in whole blood, which comprises:

(a) a first binding reagent which has the capability of specifically binding to the analyte, the first binding reagent being labeled with a photoprotein, aequorin;

15 (b) a second binding reagent which has the capability of specifically binding to the analyte and which has the capability of binding to a third binding reagent that is immobilized on a solid support;

(c) solid particles having immobilized thereon a third binding reagent that is capable of binding to the second binding reagent.

20 17. A kit for performing a specific binding assay for an analyte in whole blood, which comprises:

(a) a labeled analyte which has been labeled with a luminescent photoprotein, aequorin;

25 (b) a second binding reagent which has the capability of specifically binding to the analyte and which has the capability of binding to a third binding reagent that is immobilized on a solid support;

(c) solid particles having immobilized thereon a third binding reagent that is capable of binding to the second binding reagent.

18. The kit of claim 16 or 17, wherein each of the first and second binding reagents is an antibody or an immunoreactive fragment thereof.

30 19. The kit of claim 18, wherein at least one of the antibodies is a monoclonal antibody.

- 17 -

20. The kit of claim 16 or 17, wherein each of the first and second binding reagents is a nucleic acid.

21. The kit of claim 16 or 17, wherein the second binding reagent is biotinylated and the third binding reagent is avidin or streptavidin.

5 22. The kit of claim 16 or 17, wherein the solid particles are magnetic particles.

23. The kit of claim 21, wherein the solid particles are magnetic particles.

1/1

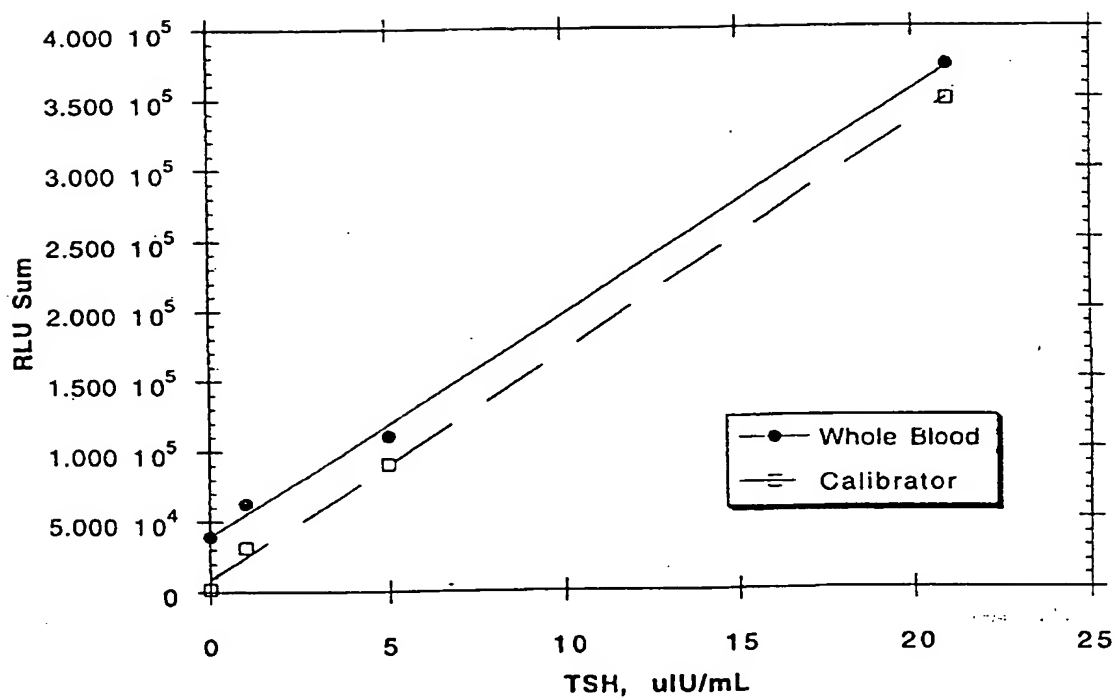


FIG. 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 98/00247

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 486 455 A (STULTS) 23 January 1996 cited in the application see column 1, line 29 - column 1, line 39 see column 4, line 26 - column 4, line 35 see column 5, line 26 - column 5, line 31 see column 6, line 34 - column 6, line 67 see column 7, line 1 - column 7, line 15 ---	1,2,5-7, 10-21
Y	BIRKMEYER RICHARD C. ET AL.: "Application of novel chromium dioxide magnetic particles to immunoassay development" CLIN.CHEM., vol. 33, no. 9, 1987, WINSTON-SALEM,N.C., pages 1543-1547, XP002061168 see the whole document --- -/-	1-3,8,9, 16,17, 22,23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

**\* Special categories of cited documents :**

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 April 1998

Date of mailing of the international search report

17. 04. 98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schorsack, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 98/00247

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4 661 408 A (LAU HON-PENG P ET AL) 28 April 1987 cited in the application see column 1, line 6 - column 1, line 10 see column 3, line 15 - column 3, line 25 see column 3, line 58 - column 3, line 65 ---	1-3,8,9, 16,17, 22,23
Y	EP 0 137 515 A (UNIV GEORGIA) 17 April 1985  see the whole document ---	1,2,5-7, 10-12, 16-20
Y	EP 0 372 352 A (CHISSO CORP) 27 November 1989  see page 2, line 34 - page 2, line 45 see page 3, line 33 - page 3, line 34 see page 4, line 56 - page 5, line 25; claims ---	1,2,5,7, 10-12, 16,17,20
Y	US 5 521 319 A (HUBER ERASMUS ET AL) 28 May 1996 see the whole document ---	13-15,21
A	US 5 200 313 A (CARRICO ROBERT J) 6 April 1993 see column 1, line 46 - column 2, line 61 ---	13-15,21
A	WO 89 11102 A (ANGENICS INC) 16 November 1989  see claims; figures ---	1-3,8, 16,17, 22,23
A	WO 93 19366 A (DIATRON CORP) 30 September 1993 see claim 1 ---	1
A,P	EP 0 768 530 A (NIPPON PAINT CO LTD) 16 April 1997 see the whole document ---	1-22
A	EP 0 724 156 A (NIPPON PAINT CO LTD) 31 July 1996 see the whole document -----	1-22

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 98/00247

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5200313 A		AU 4259785 A	05-12-85
		CA 1253777 A	09-05-89
		DE 3586659 A	22-10-92
		DE 3586660 A	22-10-92
		DK 242685 A,B,	02-12-85
		EP 0163220 A	04-12-85
		EP 0339686 A	02-11-89
		EP 0336454 A	11-10-89
		FI 852160 A	02-12-85
		JP 1830339 C	15-03-94
		JP 5031109 B	11-05-93
		JP 60262055 A	25-12-85
		JP 2043440 C	09-04-96
		JP 5168472 A	02-07-93
		JP 7068280 B	26-07-95
		US 4833084 A	23-05-89
-----			
WO 8911102 A	16-11-89	CA 1332148 A	27-09-94
		EP 0413758 A	27-02-91
		JP 5504828 T	22-07-93
		US 5145784 A	08-09-92
-----			
WO 9319366 A	30-09-93	CA 2132708 A	30-09-93
		EP 0632893 A	11-01-95
-----			
EP 0768530 A	16-04-97	NONE	
-----			
EP 0724156 A	31-07-96	AU 4213396 A	01-08-96
		CA 2168156 A	27-07-96
		JP 8262024 A	11-10-96
-----			